Aspectos comparativos de la determinación de la actividad lítica de la lisozima

Castro, Felipe[1]; Analía Rodríguez[2]; Graciela Juárez[2]; Francisco Fernández[2]

[1] Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, Tucumán, Argentina. juanfelipecastro@yahoo.com.ar
[2] Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

➤ **Resumen** — La lisozima está presente en la leche de numerosas especies de mamíferos y su determinación es importante en medicina, veterinaria y biología experimental. El presente trabajo está dirigido a demostrar que el método usual de medición mediante la lisis bacteriana, el método turbidimétrico, presenta problemas intrínsecos que lo hacen inadecuado para un empleo sistemático. Los ensayos de medición de los efectos de esta enzima en leche de tres especies de mamíferos (tapir, loba marina y humana) con diferentes diluciones muestran que, en las determinaciones a tiempos prolongados, los valores de lisis no son proporcionales a las concentraciones de la lisozima, ni a los efectos líticos extrapolados al primer segundo de tiempo de incubación. Asimismo se demostró que después de cierto lapso de incubación -y de lisis-, y a pesar de la existencia de bacterias indemnes, gran parte de la lisozima no se encuentra unida a las bacterias, sino que está en el sobrenadante. La falta de correlación entre concentración y efecto lítico a largo plazo hace no recomendable el método turbidimétrico para medir la actividad de la lisozima con fines comparativos o referenciales.

Palabras clave: Lisozima, leche, método turbidimétrico, mecanismos innatos de defensa.

➤ **Abstract** — "Comparative aspects on the determination of lytic activity in lysozyme". Lysozyme is a bacteriolytic enzyme found in milk of a large number of mammalian species. Its determination is useful in medicine, veterinary and experimental biology. The present study shows the usual method of measurement using bacterial lysis, the turbidimetric method, presenting intrinsic problems making its use inadequate. Assays of lysozyme activity were carried out in milk of three mammalian species (tapir, southern sea lion, and human) using different dilutions. It was shown that lytic values were not proportional to lysozyme concentration over time, neither to lytic effects extrapolated to the first second of incubation. Moreover it was shown that after a certain incubation time, and lysis, and in spite of non damaged bacteria, a great part of the lysosyme was not found united to bacteria but in the supernatant liquid. The lack of correlation between lysozyme concentration and lytic effects over time make the turbidimetric method non recommendable for measuring lysosyme activity for comparative and referential purposes.

Keywords: Lysozyme, milk, turbidimetric method, innate defense mechanisms.

INTRODUCCIÓN

La lisozima es una enzima ampliamente distribuida en los seres vivos cuya principal actividad consiste en la hidrólisis de los enlaces glicosílicos existentes entre los residuos alternantes que forman parte de la estructura de peptidoglicanos de las paredes bacterianas produciendo su lisis. Esta enzima ha sido estudiada en virus, bacterias, plantas, protozoos, invertebrados, vertebrados, y dentro de éstos especialmente en mamíferos, todo lo cual es fácilmente comprobable mediante el acceso a las bases de datos especializadas sobre proteínas y enzimas. En los mamíferos, forma parte de los sistemas de defensa de la secreción láctea (Jolles y Jolles, 1984; Fernández y Saad de Schoos, 1999; Ibrahim *et al.*, 2001) en la mayor parte de las especies estudiadas. Es pertinente mencionar que esta proteína también puede matar bacterias mediante la alteración funcional de la membrana celular sin destruir la pared de peptidoglicano (Düring *et al.*, 1999; Ibrahim *et al.*, 2001; Gandhe *et al.*, 2007). La determinación de su actividad se

Recibido: 13/04/09 – Aceptado: 29/07/09

efectúa en la inmensa mayoría de los casos mediante el método turbidimétrico o sea midiendo la lisis de una suspensión de bacterias susceptibles, habitualmente *Micrococcus luteus*, mediante la disminución de la densidad óptica. La simplicidad y rapidez del método lo ha convertido en uno de los más utilizados, con gran variedad de propósitos (Jenzano *et al*., 1986; McKenzie *et al*., 1986; White *et al*., 1993; Bachali *et al*., 2002; Gandhe *et al*., 2007; Tyagi *et al*., 2007; Jiménez-Cantizano *et al*., 2008), en diferentes aplicaciones de la biología experimental y aplicada.

No obstante, los numerosos trabajos en este campo muestran claros indicios, debido a la falta de reproducibilidad coherente, o comparatividad en los resultados, de la necesidad de efectuar estudios más amplios de las características de la actividad lítica de la lisozima. De hecho, la actividad lítica que se mide es un efecto que no es directamente homologable a la actividad enzimática en el sentido bioquímico estricto. A pesar de ello, existe una no cuestionada aceptación de que el efecto que se observa representa una función con atributos correspondientes a una actividad enzimática en sentido clásico encuadrable, por ejemplo, en los postulados de Michaelis y Menten. En el presente trabajo, nos limitamos a cuestionar únicamente el uso del método turbidimétrico como forma de cuantificar la lisozima.

En este sentido, debemos aclarar que, aunque en número ínfimo en relación a los que utilizan el mencionado procedimiento, esta enzima también ha sido estudiada y medida utilizando sustratos solubles (hexa-metil-glucosamina; methylumbelliferyl-triacetyl-chitotriose, etc.) (Banerjee *et al.*, 1973; Yang y Hamaguchi, 1980; O´Brien y Colwell, 1987; Tsai 1997; Eisenthal y Danson, 1998; Viallet *et al.*, 2002; Chongqiu y Luo, 2004). Con ello, se respetan los postulados de Michaelis-Menten, derivándose lícitamente los valores K_m, V_{max}, K_{cat}, etc. Para ser consecuente con lo que sostenemos, en lo que sigue trataremos de evitar el uso de la terminología enzimática clásica para referirnos a los efectos líticos observables de la lisozima.

El objetivo general de este trabajo tiene un sentido exclusivamente práctico: está destinado a tratar de demostrar que los métodos turbidimétricos para la medición de la lisozima no asegura resultados que sean confiables y comparables. No entran dentro de este trabajo el análisis de existencia o ausencia de los posibles mecanismos asociados tales como la posible influencia de restos de paredes microbianas, de presencia de eventuales inhibidores, ni de la relación cuantitativa entre molaridad de la lisozima y número de bacterias. Ello es tratado en otro trabajo (Castro *et al.*, en preparación). No obstante, hay conclusiones indicativas sobre los aspectos mencionados que se deducen de los resultados.

En este trabajo, trataremos de comprobar los siguientes hechos acerca del método turbidimétrico: a) que en las mediciones a mediano y largo plazo, los efectos líticos no son proporcionales a la concentración de la lisozima; b) que la enzima no sigue unida a bacterias después de la lisis; y c) que el efecto lítico inicial con la cual se lleva a cabo el efecto lítico cambia en forma que no es esperable a lo largo de los ensayos si se tiene en cuenta la concentración de la lisozima. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando leche de tres especies de mamíferos filogenéticamente distantes, pertenecientes a tres Órdenes distintos, Carnívora, Perisodactyla y Primates, a fin de obtener conclusiones generales evitando en lo posible los sesgos debido a características comunes a taxones cercanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de leche de tapir (*Tapirus terrestris*), de loba marina (*Otaria flavescens*), y leche materna (*Homo sapiens*), correspondientes al período maduro de la lactancia. Las muestras de leche de tapir, que habíamos constatado que tienen actividad de lisozima (Van Nieuwenhove *et al.*, 2001), fueron obtenidas en la Reserva de Flora y Fauna Horco Molle de la Facultad de Ciencias Naturales e IML de la Universidad Nacional de Tucumán. Las muestras de loba marina se obtuvieron de animales origina-

rios de Punta Norte, Península de Valdés, Chubut, Argentina. En ensayos previos, habíamos determinado que poseen actividad de lisozima (Castro *et al*., inédito). Las muestras de leche materna corresponden a dadoras voluntarias y fueron obtenidas por personal del Instituto de Fisiología Animal de la Fundación Miguel Lillo. Las caseínas de las muestras se precipitaron llevándolas a pH 4,6 con igual volumen de buffer acetato 500 mM, se centrifugaron, y se utilizó el sobrenadante. También, en algunos casos, se utilizaron muestras en las cuales las caseínas fueron precipitadas por centrifugación en frío. Dentro de los límites de los objetivos del presente trabajo, no se observaron diferencias en los resultados obtenidos entre distintos tratamientos para separación de caseínas. Para la lisis, se utilizaron *Micrococcus luteus* (Sigma, MO, USA), los cuales fueron suspendidos en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8. También se efectuaron ensayos con buffer HEPES con la misma molaridad y pH. Para cada ensayo se colocaron en la cubeta de lectura 1,5 ml de una suspensión de *M. luteus* en los tampones mencionados, con densidades ópticas (D.O.) entre 0,600 y 1,200 U, dependiente del tipo de ensayo a realizar, medidas a 540 nm. A continuación, se agregó 100 ìl de la muestra de lactosuero en la dilución planeada. Se mezclaba inmediatamente y se realizaba la primera lectura. Después de ésta se realizaba una lectura cada 15 segundos durante los primeros cinco minutos y luego cada 5 o 10 minutos. La experiencia demostró que después de los primeros cinco a ocho minutos los cambios en la densidad óptica eran muy regulares.

Debido a las diferencias en los valores de actividad presentes entre las tres especies, las muestras sufrieron distintas diluciones. La duración de las lecturas se extendieron entre 40 y 55 minutos, según se muestra en los gráficos, y en algunos casos mayor tiempo, lo que se menciona en el texto.

En los ensayos con leche de tapir, las muestras de lactosuero obtenido fueron usadas sin diluir (100 %) y diluidas al 20 % y al 10 %. Las muestras de lactosuero de leche materna se usaron sin diluir (100 %) y diluidas al 10 %. En los ensayos de loba marina, las muestras correspondieron al lactosuero sobrenadante diluido al 20 %, 10 %, y 2,5 %.

Para graficar los resultados, se restó el valor de la D.O. de cada medición sucesiva del valor de la D.O. inicial (primera medición), con lo cual se obtenía una curva ascendente demostrativa del grado de lisis. La disminución de la D.O. producida por la lisis fue leída a 540 nm en un espectrofotómetro HP 8453.

Para examinar si la enzima continuaba unida a las bacterias se efectuaron ensayos de reincubación con micrococos nuevos con el sobrenadante de ensayos previos. Para ello, se utilizó una muestra de lactosuero materno de menor actividad y diluido al 10 %. En el desarrollo de un ensayo (primera incubación), se tomaron alícuotas en el momento en que la lisis había producido un 50 % de la disminución de la D.O. original. Las alícuotas se centrifugaron a 15.000 rpm, en una centrífuga refrigerada Presvac durante 5 minutos a 4 °C, y se separó el sobrenadante. Este sobrenadante fue leído en el espectrofotómetro durante 2 minutos. A continuación, se le agregaron nuevos micrococos (segunda incubación), logrando una D.O. igual a la inicial del paso anterior, y se continuó leyendo la variación de absorbancia en la nueva suspensión.

En los gráficos, se muestran dos tipos de representaciones de los resultados para cada una de las especies. En primer lugar, el ya mencionado que muestra el progreso de la lisis en la cubeta, lo cual puede asimilarse al "producto" que se va acumulando a medida que transcurre el ensayo. Para calcular la lisis inicial, se analizaron los datos de los primeros cinco minutos mediante la adecuación a una curva exponencial del tipo $y = a(1-b^x)$ (Origin 6.1, OriginLab Corp. USA), calculándose la lisis inicial para el primer segundo de la incubación. Esta Tasa de Lisis Inicial (TLI) se representa como U en el texto, donde U representa el cambio de absorbancia (en 0,001 U de D.O.) por minuto. La dimensión "-D.O." que figura en la ordenada corresponde, como se ha señalado, a la variación de la Absorbancia cambiada de sig-

no. El otro tipo de representación corresponde a la variación de la velocidad (tasa de lisis) entre cada lectura. Para ello se ha calculado la variación en cada período en el cual se produce la lisis, a partir de la diferencia entre dos lecturas sucesivas de cada ensayo. Esta variación de la densidad óptica constituye el efecto lítico llevado a cabo por minuto, representada en la ordenada, a la cual denominamos "tasa de lisis". Por otra parte, las curvas y las ecuaciones resultantes de estos ensayos que se muestran en las figuras se calcularon mediante la planilla de cálculo de OpenOffice (línea de tendencia/potencial). El tratamiento estadístico se llevó a cabo con los software GraphPad Instat 3.0 (USA), y StatMate 1.01 (USA).

RESULTADOS

Los resultados que se muestran en primer lugar son aquellos en los que se determinó la actividad bacteriolítica, en la forma de progreso de la lisis (Figs. 1, 3 y 5) y cambios en la tasa de lisis (Figs. 2, 4 y 6), de distintas concentraciones de lisozima en cada una de las tres especies. En segundo lugar, se exponen los resultados sobre la actividad lítica en el sobrenadante del líquido de ensayo (Figs. 7 y 8).

Leche de tapir. En Fig. 1, se observa el comportamiento de tres muestras cuyas concentraciones guardan una relación de 100, 20, y 10. Las tasas de lisis iniciales fueron calculadas mediante extrapolación al primer segundo de incubación y proporcionaron los siguientes valores: lactosuero obtenido de la precipitación (LS) sin diluir (LS 100), 4134 U; LS diluido al 20 % (LS 20), 914 U; LS 10, 465 U. Estas tasas guardan entre ellas una relación de 100: 22: 11, lo cual se corresponde en forma muy aceptable con las concentraciones de las muestras. La representación de las tasas de lisis (Fig. 2) muestra que los valores de la primera muestra (100 %) disminuyen mucho más rápidamente que las correspondientes a las otras, de manera tal que a los 4 minutos su tasa fue menor que la correspondiente a la segunda muestra y a los 10 minutos fue inferior a la tercera muestra, la cual tenía una concentración 10 veces menor. El resultado (Fig. 1) muestra que la lisis total efectuada por la segunda muestra supera a la de mayor concentración a los 40 minutos, y que incluso la de menor concentración supera a la primera a los 60 minutos (no se muestra en las Figuras). Cabe mencionar que, en las Figuras que muestran la variación de las tasas de lisis en el transcurso de los ensayos, la caída

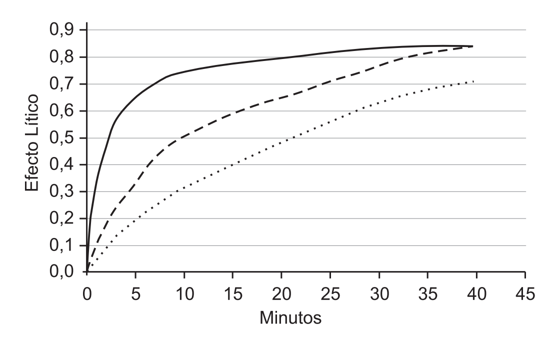


Figura 1. Efecto lítico del lactosuero de tapir. Línea continua, sin diluir (LS 100 %; TLI = 3840 IU); línea de rayas, dilución 20 % (TLI = 780 IU); línea de puntos, dilución al 10 % (TLI = 340 IU). El efecto lítico de la ordenada es la D.O. cambiada de signo, o sea grado de disminución de la Absorbancia de la muestra durante el ensayo. El incremento de la curva implica el aumento del lisado.

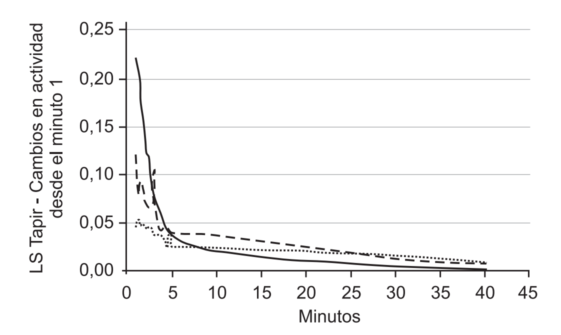


Figura 2. Lactosuero de tapir. Cambio de la tasa de lisis en el transcurso del ensayo. UA: 1 Unidad de Absorbancia equivale a 1000 unidades de lísis por ml y por minuto. Línea continua, LS 100 %; línea de rayas, LS 20 %; línea de puntos, LS 10 %. Las ecuaciones corresponden a la adecuación de los datos a la curva de potencia; en todos los casos: P < 0,0001.

de los valores corresponde al hecho que la velocidad lítica cae a valores bajos, y no significa que la D.O. de la suspensión se acerque a cero.

Leche materna. En estos ensayos ocurre algo similar. En la Fig. 3, se muestran los resultados de la actividad lítica en función del tiempo con dos concentraciones distintas de la enzima. Si bien la mayor lisis inicial corresponde a la muestra con mayor concentración de lisozima, esta tiende a alcanzar una meseta mucho antes que la otra muestra. La primera muestra pierde velocidad (Fig. 4), de forma tal que a los diez minutos su tasa de lisis es inferior a la de menor concentración. A partir de los datos procesados, se observó que, para estas concentraciones de lisozima, no hay relación estricta entre éstas (100:10) y las tasas de lisis iniciales (LS 100, 4837 U; LS 50, 2375 U), lo que será discutido más adelante.

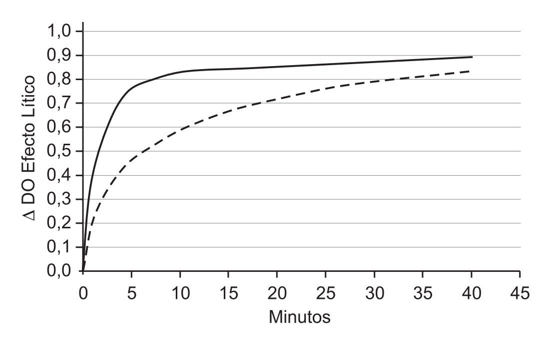


Figura 3. Efecto lítico del lactosuero de leche materna. Línea continua, sin diluir (LS 100 %; V.i. 4420 UI); línea de rayas, dilución 10 % (V.i. 2170 UI). El efecto lítico de la ordenada (-D.O.): igual a Fig. 1.

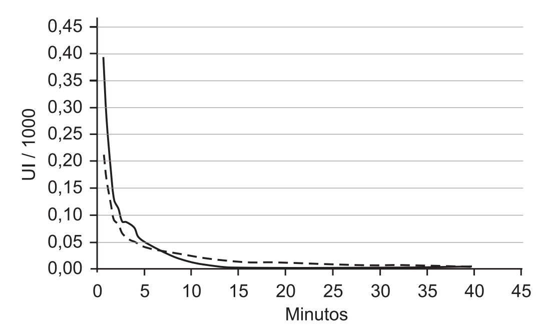


Figura 4. Lactosuero materno. Cambio de la tasa de lisis en el transcurso del ensayo. UA: 1 Unidad de Absorbancia equivale a 1000 unidades de lísis por ml y por minuto. Línea continua, LS 100 %. Línea de rayas, LS 10 %. Las ecuaciones corresponden a la adecuación de los datos a la curva de potencia; en todos los casos: $P < 0{,}0001$.

Leche de loba marina. Las muestras de leche de loba marina tienen un comportamiento similar. En Fig. 5, se muestran las lisis producidas por tres diluciones de la muestra, donde se han graficados hasta los 55 minutos, observándose que en este lapso la lisis acumulada de la muestra diluida al 10 % ya alcanza a la del 20 %. Cuando se comparan las concentraciones de la lisozima (100:10:2,5) con las TLI (3528 U; 1370 U; 703 U), se encuentra una aceptable correspondencia entre ambas ($r=0{,}977$; $p=0{,}023$). En Fig. 6, se ve claramente la variación de las tasas de lisis de manera tal que la muestra de mayor concentración es alcanzada o superada por las correspondientes a las de menor concentración antes de los 10 minutos.

La absorbancia del sobrenadante conteniendo lactosuero materno, que había sido separado durante la incubación, fue leída en el espectrofotómetro y no mostró disminución significativa de la D.O. a 540 nm durante 2 minutos de observación. Esta solución era resultante de centrifugar un ensayo en el momento en que se había lisado el 50 % de las bacterias. Cuando se agregaron nuevos micrococos a este sobrenadante se observó una nueva actividad de lisis (Fig. 7). La lisis inicial de la nueva actividad (TLI 745 U) fue un 13 % inferior a la tasa de lisis inicial de la primera incubación (TLI 857 U). Asimismo, en este ensayo, a diferencia de los anteriormente descritos, la actividad lítica total de la segunda incubación, que tenía menor valor al comienzo, no llegó a superar a la correspondiente de la primera incubación. Por otra parte, si bien la tasa de lisis de la primera incubación fue superior en los primeros minutos a la correspondiente a la segunda, ambas disminuyeron de una forma que quedaron equilibradas después de los 10 minutos (Fig. 8).

DISCUSIÓN

En los resultados descritos, observamos que en las tres especies se produce la situación que, a largo plazo, sean minutos o horas, las muestras de lactosuero con menor concentración de enzima producirán el mismo efecto lítico, o aún mayor que el de aquellas muestras que la superen en concentración. Asimismo observamos que la rapidez con la cual se produce el efecto observable (la lisis) disminuye de una manera tal que depende de la concentración de lisozima: las de mayor concentración enlentecen más rápido. Una consecuencia de ello se observa en el hecho que, por ejemplo, a los 6 minutos de incubación, las tres concentraciones de leche de tapir tienen tasas de lísis (velocidad de destrucción de bacterias) muy similares.

También observamos, a partir de la centrifugación de la muestra a la mitad de un ensayo, que gran parte del componente responsable del efecto (la molécula de lisozima) no se encuentra unida a las bacterias precipitables, sino que se encuentra en el sobrenadante. Con el agregado de nuevos micrococos, la lisis se reinicia a una tasa de un 87 % respecto a la original anterior, lo que indicaría que solamente un 13 % de la enzima está unido al material corpuscular precipitado con la centrifugación.

Un aspecto ineludible que distingue la acción de la lisozima es que su efecto se lleva a cabo sobre un sustrato particulado (bacterias). Cada una de estas bacterias constituye la unidad del efecto lítico. Ello deriva del hecho que el efecto mensurable es consecuencia física mediada resultante de la (suficiente) destrucción de la pared celular y de la lisis subsiguiente. Por otra parte, si se considera a la relación lisozima-sustrato representada por el número de moléculas de la primera en función del número de bacterias, la proporción es exageradamente alta a favor del número de enzimas, en varios órdenes de magnitud, y esta situación está muy alejada de lo sostenido por la teoría enzimática clásica.

Asimismo, hay que considerar que, en el método turbidimétrico, la actividad de las moléculas de lisozima puede seguir operando sobre los restos de las paredes microbianas, como además, podría intercambiar esta unión entre restos de pared y las células indemnes. Esto último dependerá de factores tales como las relaciones cuantitativas y las afinidades, aspectos que no se han analizado en este trabajo.

De todo ello, se desprende que la naturaleza corpuscular del sustrato presenta aspectos que constituyen condiciones particulares

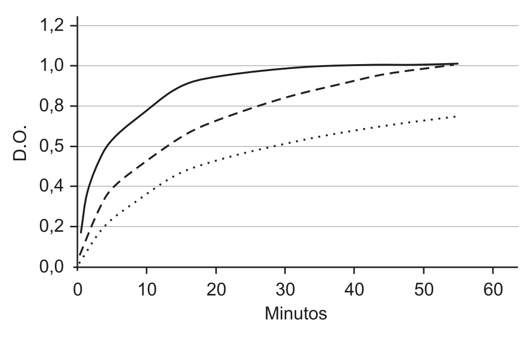


Figura 5. Efecto lítico del lactosuero de loba marina. Línea continua, dilución 20 % (TLI = 2990 IU); línea de rayas, 10 % (TLI = 1180 IU); línea de puntos, 2,5 % (TLI = 470 IU). El efecto lítico de la ordenada (-D.O.) igual a Fig. 1.

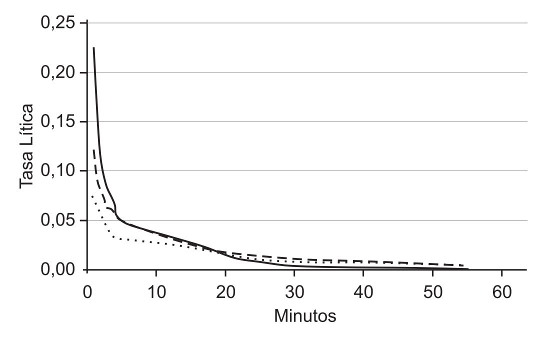


Figura 6. Lactosuero de loba marina. Cambio de la tasa de lisis en el transcurso del ensayo. UA: 1 Unidad de Absorbancia equivale a 1000 unidades de lísis por ml y por minuto. Línea continua, LS 20 %. Línea de rayas, LS 10 %. Línea de puntos, LS 2,5 %. Las ecuaciones corresponden a la adecuación de los datos a la curva de potencia; en todos los casos: $P < 0,0001$.

distintas a las supuestas o requeridas para lo aceptable en la teoría enzimática.

No hemos investigado en este trabajo el efecto que pueden ejercer los restos de las paredes bacterianas lisadas, ni el efecto diferencial que tendrían el tamaño y la cantidad de estos restos de pared, lo que implicaría el estudio de la diferencia en la afinidad de la lisozima por la pared íntegra o por los restos de peptidoglicanos.

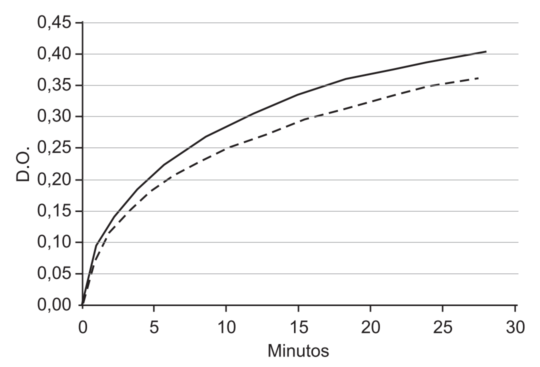


Figura 7. Efecto lítico de lactosueros. Línea continua: primera incubación con LS de leche materna al 10 % (V.i. 750 IU); línea de rayas: segunda incubación con el sobrenadante de la 1ª incubación (V.i. 630 IU). El efecto lítico de la ordenada (-D.O.) igual a Fig.1.

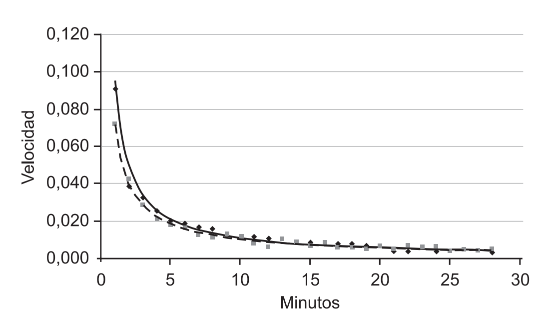


Figura 8. Cambio de la tasa de lisis en el transcurso del ensayo de 1ª incubación del LS, línea continua con rombos ($y = 0{,}0955x^{-0{,}9382}$; $R^2 = 0{,}9665$; $r = 0{,}9831$; $p < 0{,}0001$); 2ª incubación del LS, línea de rayas con cuadrados grises ($y = 0{,}073x^{-0{,}849}$; $R^2 = 0{,}9571$; $r = 0{,}9783$; $p < 0{,}0001$). UA: 1 Unidad de Absorbancia equivale a 1000 unidades de lísis por ml y por minuto. Las ecuaciones corresponden a la adecuación de los datos a la curva de potencia; en todos los casos: $P < 0{,}0001$.

En bacterias gram (-), se han encontrado inhibidores de la lisozima (Monchois *et al.*, 2001). No se ha demostrado, a partir del ensayo de centrifugación y uso del sobrenadante en este trabajo, la generación, por parte de las bacterias lisadas, de moléculas o material que claramente inhiban el efecto lítico de la lisozima.

A partir de los resultados antes mencionados, se puede sostener que una parte significativa de la lisozima se encuentra unida a restos celulares, dado que no precipitan y se recupera un 84 % de la actividad lítica. El hecho que la nueva tasa de lisis de la nueva incubación haya sido menor que la correspondiente a la primera es compatible con la hipótesis de un enlentecimiento por la presencia de un mayor número de restos de paredes y generación de material que desvía a la actividad de la lisozima del efecto celulítico.

Por otra parte, se ha observado que las tasas líticas iniciales están relacionadas con las concentraciones de la enzima en forma distinta según las especies, siendo buena la concordancia para los ensayos con tapir, aceptable para loba marina, y limitada en leche materna. A partir de la información que manejamos, parte de la explicación puede basarse en el hecho que existieran diferencias entre especies en lo que se refiere a una distinta afinidad de la lisozima por la red de peptidoglicano de la bacteria íntegra en comparación a la afinidad por los restos de pared. Tampoco descartamos el importante papel de la concentración del sustrato, como así también muy probablemente lo relacionado con la presencia de otras moléculas de la secreción láctea que se pudieran unir a la pared de peptidoglicano, factores que pueden ser diferentes según la especie. Estos aspectos y el relacionado con la medición de la tasa de lisis son tratados en otro trabajo que estamos desarrollando (Castro *et al.*, inédito).

No hemos encontrado en un listado de más de 1300 publicaciones sobre la lisozima de distintos orígenes, desde 1967 a la fecha, ninguno en el cual se haya determinado el valor del K_m, mediante el método turbidimétrico. Esta lista es obtenible a partir de las

bases de datos de PubMed en la que se catalogan 34 características para cada enzima. Ello constituye un fuerte indicio en el sentido que el método no es aplicable para estudios cinéticos clásicos.

A partir de los resultados anteriores, consideramos que no es aconsejable el uso de métodos turbidimétricos para determinar la lisozima, y menos aún a tiempos fijos. De hecho, estos métodos pueden producir resultados contradictorios, además de que no se pueden comparar muestras de distinto origen y diferente dilución.

AGRADECIMIENTOS

A las Dras. Marcela Uhart y Myrta Lewis por la provisión de muestras de leche de loba marina. Este trabajo se ha llevado a cabo con apoyo de la Fundación Miguel Lillo y del subsidio 26-G415 del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán.

LITERATURA CITADA

Chongqiu, J. y Luo, L. 2004. Lysozyme enhanced europium-metacycline complex fluorescence: a new spectrofluorimetric method for the determination of lysozyme. Analytica Chimica Acta, 511: 11-16.

Düring, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkmann, O. y Gieffers, W. 1999. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozyme. FEBS Letters, 449: 93-100.

Eisenthal, R. y Danson, M. J. 1998. Enzyme Assays: A Practical Approach. IRL Press, Oxford University Press, New York.

Fernández, F. M. y Saad de Schoos, S. 1999. Funciones de los componentes de la leche: Un enfoque biológico. Editorial Fundación M. Lillo, Tucumán, 164 pp.

Gandhe, A. S., Janardhan, G. y Nagaraju, J. 2007. Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkmoths (Lepidoptera) that resemble lysozyme but lack muramidase activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37: 655-666.

Ibrahim, H. R., Matsuzaki, T. y Aoki, T. 2001. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. FEBS Letters, 506: 27-32.

Jenzano, J. W., Hogan, S. L. y Lundblad, R. L. 1986. Factors influencing of human salivary lysozyme in lysoplate and turbidimetric assays. Journal of Clinical Microbiology, 24: 963-967.

Jiménez-Cantizano, R. M., Infante, C., Martin-Antonio, B., Ponce, M., Hachero, I., Navas, J. I. y Manchado, M. 2008. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozyme in brill (*Scophthalmus rhombus*). Fish and Shellfish Immunology, 25: 57-65.

Jolles, P. y Jolles, J. 1984. What´s new in lysozyme research? Molecular and Cellular Biochemistry, 63: 165-189.

Monchois, V., Abergel, C., Sturgis, J., Jeudy, S. y Claverie, J. M. 2001. *Escherichia coli ykfE* ORFan gene encodes a potent inhibitor of C-type lysozyme. The Journal of Biological Chemistry, 276: 18437-18441.

O´Brien, M. y Colwell, R. R. 1987. A rapid test for chtinase activity that uses 4-umbelliferyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide. Applied and Environmental Microbiology, 53: 1718-1720.

Tsai, C. S. 1997. Molecular modelling studies of lysozyme catalysed hydrolysis of synthetic substrates. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 29: 325-334.

Tyagi, A., Khushiramani, R., Karunasagar, I. y Karunasagar, In. 2007. Antivibrio activity of recombinant lysozyme expresed from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture, 272: 246-253.

Van Nieuwenhove, C., Gonzalez, S., Saad, S. y Fernández, F. 2001. Lysozyme and lactoperoxidase activity in tapir (*Tapirus terrestris*) milk. Biocell, 25: 60.

Viallet, P. M., Vo-Ding, T., Vigo, J. y Salmon, J. M. 2002. Investigation of lysozyme-chitobioside interactions using synchronous luminescence and lifetime measurements. Journal of Fescence, 12: 57-63.

White, F. H., Balkwill, D. L., Meeter, D. A. y Merchant, K. K. 1993. Further studies on the lysozyme-like activity of a-lactalbumin: development of alternative methods of assay. Analytical Biochemistry, 212: 263-268.

Yang, Y. y Hamaguchi, K. 1980. Hydrolysis of 4-umbilliferyl N-acetyl-chitotrioside catalyzed by hen and turkey lysozyme. Journal of Biochemistry, 87: 1003-1014.